

10/561951
08/06/04

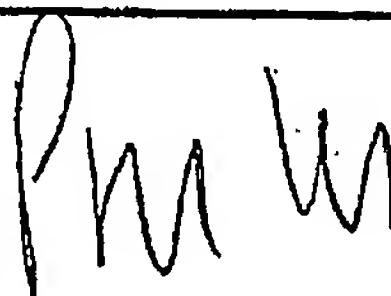
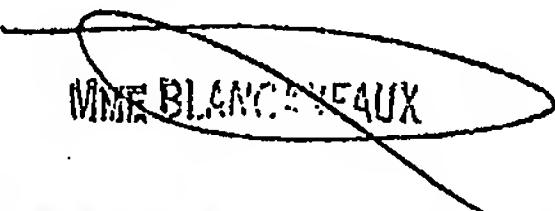
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**

BR2

REMISE DES PIÈGES	Réparés à l'INPI
DATE	25 JUIN 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0307659
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE																						
<table border="1"> <tr> <td>Nom</td> <td>VIALLE-PRESLES</td> </tr> <tr> <td>Prénom</td> <td>Marie-José</td> </tr> <tr> <td>Cabinet ou Société</td> <td>CABINET ORES</td> </tr> <tr> <td>N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>36, rue de St Pétersbourg</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75 00 8 PARIS</td> </tr> <tr> <td>Pays</td> <td>FRANCE</td> </tr> <tr> <td>N ° de téléphone (facultatif)</td> <td>01.53.21.11.00</td> </tr> <tr> <td>N ° de télécopie (facultatif)</td> <td>01.53.21.08.88</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique (facultatif)</td> <td>ores@cabinet-ores.com</td> </tr> </table>		Nom	VIALLE-PRESLES	Prénom	Marie-José	Cabinet ou Société	CABINET ORES	N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		Adresse	Rue	36, rue de St Pétersbourg	Code postal et ville	75 00 8 PARIS	Pays	FRANCE	N ° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00	N ° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88	Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com
Nom	VIALLE-PRESLES																					
Prénom	Marie-José																					
Cabinet ou Société	CABINET ORES																					
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel																						
Adresse	Rue	36, rue de St Pétersbourg																				
	Code postal et ville	75 00 8 PARIS																				
	Pays	FRANCE																				
N ° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00																					
N ° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88																					
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com																					
7 INVENTEUR (S)																						
<p>Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																			
<input type="checkbox"/> Oui																						
<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																						
8 RAPPORT DE RECHERCHE																						
<p>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Etablissement immédiat ou établissement différé</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/> Etablissement immédiat ou établissement différé	<input type="checkbox"/>																			
<input checked="" type="checkbox"/> Etablissement immédiat ou établissement différé																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non																			
<input type="checkbox"/> Oui																						
<input checked="" type="checkbox"/> Non																						
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES																						
<p>Uniquement pour les personnes physiques</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)	<input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG																			
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)																						
<input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG																						
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS																						
<p><input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences</p>																						
<p>Le support électronique de données est joint</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input checked="" type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input checked="" type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes</p>																						
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)																						
<p>VIALLE-PRESLES, Marie-José N° CPI 93-2009</p> 																						
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI																						
 <p>MME BLANCHEAUX</p>																						

La présente invention est relative à des peptides dérivés de la protéine MMP-2 et à leur utilisation en immunothérapie antitumorale.

La vaccination ou immunothérapie peptidique 5 est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'induction d'une réponse immunitaire vis-à-vis de peptides représentant des épitopes T d'antigènes tumoraux reconnus 10 par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas les antigènes protéiques entiers, mais des fragments 15 peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T.

Les épitopes présentés par le complexe majeur 20 d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II 25 (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

L'identification de ces épitopes, et notamment de ceux présentés par le CMH I (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité), 30 constitue donc une étape essentielle pour le développement de compositions d'immunothérapie antitumorale.

Le mélanome est une tumeur maligne cutanée qui se développe aux dépens des mélanocytes épidermiques que sont les cellules pigmentaires de la peau. En France, on dénombre actuellement de 9 à 10 nouveaux cas pour 100.000 5 habitants chaque année, soit près de 5.000 nouveaux malades.

Deux classes principales d'antigènes associés aux mélanomes (MAA) sont connues : les antigènes spécifiques, peu ou pas exprimés dans les tissus normaux, 10 et les antigènes de différenciation mélanocytaire, qui sont également exprimés par les mélanocytes (pour revue, voir CASTELLI et al., 2000, *J Cell Physiol*, 182, 323-31 ; KIRKIN et al., 2002, *Cancer Invest*, 20, 222-36).

En raison de la forte prévalence des cancers 15 de type mélanome, il est souhaitable d'identifier d'autres antigènes tumoraux capables d'induire une réponse immunitaire cytotoxique antitumorale.

Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont des endopeptidases Zn-dépendantes qui sont responsables 20 de la dégradation de différents composants protéiques de la matrice extracellulaire (ECM) et des membranes basales (KHASIGOV et al., 2001, *Biochemistry*, 66(2), 130-40). A l'heure actuelle, 21 membres de la famille MMP sont connus chez l'homme.

25 La sur-expression des MMPs est observée dans un grand nombre de cancers humains et est associée à un faible taux de survie. En effet, les MMPs ont la capacité de potentialiser la progression tumorale en augmentant la croissance cellulaire, la migration cellulaire et 30 l'angiogenèse (EGEBLAD and WERB, 2002, *Nat. Rev. Cancer.*, 2(3), 161-74).

La protéine MMP-2 (également dénommée gélatinase A ou collagénase de type IV ; OMIM 120360) clive le collagène de type IV, la gélatine, ainsi que 35 d'autres composants de la matrice extracellulaire. Cette protéine est exprimée dans nombre de cellules et de

tissus sains ; elle est également sur-exprimée dans de nombreux cancers. De nombreuses études ont montré qu'elle est impliquée dans la progression tumorale, les métastases et l'angiogenèse (LIOTTA et al., 1980, 5 Nature., 284 (5751), 67-8 ; ITOH et al., 1998, Cancer. Res., 58(5), 1048-51 ; BROOKS et al., 1998, Cell., 92(3), 391-400).

Du fait de sa sur-expression dans de nombreux types de tumeurs, et de son implication dans la transformation maligne et dans l'angiogenèse tumorale, il a été proposé d'utiliser MMP-2 comme cible de traitements antitumoraux, en inhibant son activité (EGEBLAD and WERB, précité ; COUSSENS et al., 2002, Science, 295 (5564), 2387-92).

15 Cependant, la protéine MMP-2 n'était pas considérée jusqu'à présent comme un antigène cible capable d'induire une réponse cytotoxique antitumorale. A fortiori, aucun épitope T de MMP-2 n'avait été identifié.

Les Inventeurs ont maintenant découvert que 20 MMP-2 pouvait être apprêtée efficacement par des cellules de mélanome pour générer des épitopes T présentés par le CMH I, et induisant des lymphocytes T cytotoxiques capables de lyser ces cellules tumorales.

La présente invention a en conséquence pour 25 objet l'utilisation d'une molécule choisie parmi :

- la métalloprotéase MMP-2 ;
 - un fragment de ladite métalloprotéase comprenant un épitope T présenté par le CMH I ;
 - un polynucléotide codant pour ladite métalloprotéase ou pour ledit fragment ;
- pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale, et plus particulièrement au traitement de mélanomes exprimant MMP-2.

Des fragments de MMP-2 utilisables conformément à la présente invention englobent notamment tout peptide immunogène constitué par 8 à 11 acides aminés consécutifs de ladite métalloprotéase, et 5 constituant un épitope T présenté par le CMH I. Ces peptides immunogènes, ainsi que les polynucléotides codant pour ces peptides, font également partie de l'objet de la présente invention.

Dans le cadre de l'exposé de la présente 10 invention, on entend par « épitope T présenté par le CMH I » un peptide capable d'induire une réponse CTL spécifique contre l'antigène dont il est issu.

A titre d'exemple non limitatif de réalisation 15 de la présente invention, les Inventeurs ont identifié un peptide présenté par HLA-A*0201, de séquence (code 1 lettre) GLPPDVQRV (SEQ ID NO : 1).

Ce peptide est capable d'induire une réponse 20 CTL spécifique vis-à-vis de cellules de mélanomes HLA-A*0201 exprimant MMP-2, et est donc notamment utilisable pour l'obtention de médicaments destinés au traitement de patients HLA-A*0201.

D'autres épitopes T conformes à l'invention peuvent être obtenus de diverses manières à partir de 25 l'antigène MMP-2.

Par exemple, il est connu que des peptides susceptibles de former un complexe avec un allèle du CMH I donné ont en commun la présence, à certaines positions, de résidus d'acides aminés particuliers, dénommés « résidus d'ancrage ». On a ainsi défini pour 30 les différents allèles du CMH I, des motifs d'ancrage spécifiques, impliquant des acides aminés dénommés « résidus d'ancrage primaires ». Il a aussi été montré que des résidus situés en dehors des motifs d'ancrage primaires (résidus d'ancrage secondaires) pouvaient 35 exercer un effet favorable ou défavorable sur l'affinité du peptide pour le CMH.

Le choix des séquences peptidiques susceptibles de constituer des épitopes présentés par un allèle du CMH I donné, peut s'effectuer, de manière classique, par l'analyse de la séquence peptidique de l'antigène MMP-2, afin de sélectionner les peptides possédant tout ou partie du motif d'ancre primaire correspondant à cet allèle. Différentes bases de données répertoriant les motifs d'ancre connus sont disponibles : à titre d'exemples, on citera la base SYFPEITHI (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>); RAMMENSEE et al., Immunogenetics, 50, 213-219, 1999), ou la base BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind ; Parker et al., J. Immunol. 152, 163, 1994).

La présente invention a également pour objet des compositions comprenant au moins un peptide immunogène conforme à l'invention ou un polynucléotide codant pour ledit peptide.

Il peut s'agir en particulier de compositions multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspéciifique, et qui dans ce but comprennent également un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s). Ces autres épitopes peuvent être issus de MMP-2, ou d'un ou plusieurs autres antigènes.

Des compositions multiépitopiques conformes à l'invention peuvent comprendre, pour être largement utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, des épitopes présentés par différentes molécules du CMH I. Elles peuvent également comprendre en outre au moins un épitope présenté par une molécule du CMH II, et capable d'induire une réponse T auxiliaire.

Selon un mode de réalisation préféré d'une composition conforme à l'invention, elle comprend au moins un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à

l'invention. Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

5 On peut par exemple injecter au patient à traiter un peptide immunogène, ou une composition conformes à l'invention tels que définis ci-dessus, éventuellement associés à un adjuvant approprié. De même, des polynucléotides conformes à l'invention, de
10 préférence intégrés dans des vecteurs d'acide nucléique, notamment des vecteurs viraux tels que des adénovirus, peuvent également être directement administrés par injection au patient à traiter.

La présente invention englobe également des
15 cellules présentatrices de l'antigène présentant un épitope T issu de MMP-2 conforme à l'invention.

Des cellules présentatrices de l'antigène conformes à l'invention peuvent être obtenues à partir de toutes les cellules capables de présenter un antigène via
20 le CMH I. Notamment, elles peuvent être obtenues à partir de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, par exemple des cellules dendritiques.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdites cellules présentatrices de
25 l'antigène sont chargées *in vitro* à l'aide d'un peptide immunogène selon l'invention, comme décrit par exemple par BAKKER et al. (Cancer Res., 55, 5330-5334, 1995) ou VAN ELSAS et al. (Eur. J. Immunol., 26, 1683-1689, 1996).

Selon un autre mode de réalisation préféré de
30 la présente invention, lesdites cellules présentatrices de l'antigène sont transfectées *in vitro* par un polynucléotide comprenant une séquence codant pour un peptide immunogène conforme à l'invention, par exemple un polynucléotide codant pour la protéine MMP-2 ou pour un
35 fragment de celle-ci.

Les cellules présentatrices de l'antigène conformes à l'invention peuvent ensuite être injectées au patient à traiter, comme décrit par exemple par KAPLAN et al. (J. Immunol., 163(2), 699-707, 1999) ou KIM et al. 5 (Annals of Surgical Oncology, 5(1), 64-76, 1998).

La présente invention englobe aussi l'utilisation de la protéine MMP-2, ou d'un fragment de celle-ci, et notamment d'un peptide immunogène selon l'invention, pour la détection de CTLs dirigés contre 10 MMP-2 dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet atteint de mélanome.

Ces peptides peuvent également être utilisés pour réaliser le tri spécifique de ces CTLs. Les CTLs ainsi isolés peuvent ensuite être amplifiés *in vitro* et 15 réinjectés en grand nombre (de l'ordre du milliard) au patient.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de préparation de CTLs dirigés contre MMP-2, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection, à partir 20 de CTLs prélevés sur un patient atteint de mélanome, de ceux reconnaissant la protéine MMP-2, ou un fragment de celle-ci, et notamment un peptide conforme à l'invention, et la multiplication *in vitro* des lymphocytes T ainsi sélectionnés.

25 La présente invention a également pour objet une préparation de CTLs dirigés contre la protéine MMP-2, et en particulier une préparation de CTLs susceptibles d'être obtenue par le procédé défini ci-dessus.

La présente invention englobe également les 30 médicaments comprenant un principe actif choisi parmi :

- un peptide immunogène conforme à l'invention ;
- une composition multiépitopique conforme à l'invention ;
- un polynucléotide conforme à l'invention ;

- une cellule présentatrice de l'antigène conforme à l'invention ;
- une préparation de CTLs conforme à l'invention.

5 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'induction d'une réponse cytotoxique antitumorale par un peptide conforme à l'invention issu de l'antigène MMP-2.

10 EXEMPLE 1 : CARACTERISATION D'UN CLONE CTL (CLONE M134.12) RECONNAISSANT DES LIGNEES DE MELANOME HLA-A2.

Des clones CTL ont été obtenus en stimulant par des cellules tumorales autologues (selon le protocole décrit par PANDOLFINO et al., 1992, *Eur. J. Immunol.*, 15 22(7), 1795-802) des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) d'un patient (HLA A*0201, B*0801, Cw*0701) atteint de mélanome. Ces clones CTL sont capables de lyser spécifiquement les cellules tumorales autologues, et de sécréter du TNF α et de l'IFN γ en réponse à la stimulation 20 par ces cellules

L'un de ces clones (CTL M134.12) a été retenu pour la suite des expérimentations.

Le clone CTL M134.12 a été co-cultivé en présence de la lignée autologue M134, et de différentes 25 lignées allogéniques (M17, M113, M147, M153, M204, FM25, FM29, IPC 277/5, M25, M44, M88, M102, M117, M171, M199, M200) issues de mélanomes de différents patients HLA A*0201.

Après 6 heures de culture, les surnageants ont 30 été prélevés et leur concentration en TNF α a été déterminée par mesure de la cytotoxicité de ces surnageants de culture pour le clone 13 de WEHI 164, comme décrit par DE PLAEN et al. (Methods, 12, 125-42, 1997).

35 Les résultats sont illustrés dans la Figure 1. En ordonnée, la concentration de TNF α en pg/ml.

En abscisse, les différentes lignées testées.

Le clone CTL M134.12. reconnaît, outre la lignée M134, neuf lignées cellulaires allogéniques de mélanome exprimant HLA A*0201. Ceci indique que ce clone 5 CTL reconnaît un antigène commun à ces lignées et présenté par l'allèle HLA A*0201.

EXEMPLE 2 : IDENTIFICATION DE L'ANTIGENE RECONNU PAR LE CLONE CTL M134.12.

Pour identifier l'antigène reconnu par le 10 clone CTL M134.12, une banque d'ADNc a été construite à partir des ARNm de la lignée cellulaire tumorale M134.

Construction de la banque d'ADNc

Les ARNm Poly-(A)⁺ ont été extraits à partir des cellules M134 en utilisant le kit Fast Track 2.0 15 (Invitrogen Corp., Oxon, UK). La synthèse d'ADNc à partir des ARNm purifiés a été effectuée à l'aide d'un kit (Stratagene Inc., La Jolla, CA). Les ADNc néo-synthétisés ont été ligaturés à des adaptateurs Eco RI, puis digérés par Xho I et enfin insérés au niveau des sites Eco RI et Xho I du vecteur d'expression eucaryote 20 pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.). Les plasmides recombinants obtenus ont été électroporés dans la souche E. coli XL1 (Stratagene Inc., La Jolla, CA). Après électroporation, près de 60.000 clones résistants à l'ampicilline ont été 25 isolés. Pour permettre le criblage de ces clones, 574 groupes (chacun de 100 clones bactériens résistants à l'ampicilline) ont été créés. L'ADN plasmidique de chacun des groupes a été extrait par lyse alcaline à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen 30 S.A., Courtaboeuf, France).

Cet ADN plasmidique a ensuite été co-transfектé, dans des cellules COS-7, avec un vecteur HLA A*0201 (pHLA A*0201, obtenu auprès de T. Boon, LICR, Bruxelles, Belgique).

Transfection des cellules COS-7

Les cellules COS-7, cultivées dans du milieu DMEM (Sigma) contenant 1 g de glucose/litre et 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et de la L-glutamine, ont été transfectées par le vecteur pHLA-A*0201, seul ou en association avec l'ADN plasmidique issu de l'un des groupes de la banque d'ADNc de M134. La transfection a été effectuée selon le protocole à la DEAE-dextran-chloroquine (BRICHARD, Exp. Med. 1993, 10 1(78): 489-495). 2.10^4 cellules COS-7 ont été transfectées avec 100 ng de plasmide pHLA-A*0201 et, pour la co-transfection, 100 ng d'ADN plasmidique de la banque de M134. 48h après transfection, ces cellules COS-7 ont été utilisées pour stimuler le clone CTL M134.12 T. Après 6 15 heures de co-culture, les surnageants de culture ont été prélevés et leur concentration en TNF a été déterminée par la mesure de leur cytotoxicité pour le clone 13 de WEHI 164, comme décrit ci-dessus.

Parmi les groupes testés, un groupe positif 20 (270) a été identifié. 96 plasmides distincts de ce groupe ont été testés individuellement pour leur capacité à induire la sécrétion de TNF α par le clone CTL M134.12.

L'un de ces plasmides, dénommé pNA134-A, 25 induisant une sécrétion de TNF α comparable à celle obtenue en présence de la lignée cellulaire M134 a été sélectionné.

La Figure 2 compare la sécrétion de TNF α par le clone CTL M134.12, en l'absence de cellules stimulatrices, en présences de cellules M134, en présence 30 de cellules COS-7 non-transfектées, en présence de cellules COS-7 transfectées par le plasmide pHLA-A*0201 seul, et en présence de cellules COS-7 co-transfектées par les plasmides pHLA-A*0201 et pNA134-A.

Le séquencage de pNA134-A montre qu'il contient un ADNC de 1,3kb dont la séquence correspond à l'extrémité 3' de la séquence codant pour la métalloprotéase MMP-2 (numéro d'accession : NM_004530).
5 La protéine MMP-2 est donc l'antigène reconnu par le clone CTL M134.12.

L'insert du plasmide pNA134-A code pour les acides aminés 501-661 de MMP-2.

Afin de mieux préciser la région de MMP-2 reconnaissée par le clone CTL M134.12 des plasmides contenant des variants tronqués de l'insert d'ADNC de NA134-A (fragment 20 codant pour les acides aminés 501-661 de MMP-2, et fragment 25 codant pour les acides aminés 501-556 de MMP-2) ont été construits.
10

15 Un plasmide comprenant la totalité de l'ADNC de MMP-2 a également été construit.

Chacun de ces plasmides a été co-transfектé avec pHLA A*0201 dans des cellules COS-7, qui ont ensuite été testées pour leur capacité à induire la sécrétion de
20 TNF α par le clone CTL M134.12.

Les constructions testées sont schématisées sur la Figure 3 qui indique également leur capacité à induire ou non la sécrétion de TNF α par le clone CTL M134.12.

Ces résultats montrent que l'épitope T reconnu par le clone CTL M134.12 se situe entre les acides aminés 556 et 593 de MMP-2.
25

Une série de peptides (séquences GLPPDVQRV (SEQ ID NO : 1), LGLPPDVQRV (SEQ ID NO : 2), LPPDVQRV (SEQ ID NO : 3) et GLPPDVQR (SEQ ID NO : 4)) dérivés de
30 la région 556-593 de la protéine MMP-2 ont été synthétisés (Synt:em Nîmes, France).

Ces peptides ont été utilisés pour sensibiliser des cellules T2 marquées au ^{51}Cr . Ces cellules ont été incubées 60 minutes à 37°C avec
35 différentes concentrations de chacun des peptides à tester. Des cellules effectrices CTL M134.12 ont ensuite

été rajoutées dans un rapport cellules effectrices/cellules cibles de 10/1. La quantité de ^{51}Cr relarguée dans le surnageant est mesurée 4 heures plus tard.

- 5 Les résultats sont illustrés par la Figure 4.
En ordonnée, le pourcentage de lyse spécifique.
En abscisse, la concentration de peptide LGLPPDVQRV (●), GLPPDVQRV (■), LPPDVQRV (▲), ou GLPPDVQR (×) en nM.

Ces résultats montrent que le peptide
10 GLPPDVQRV est le plus efficace pour sensibiliser les cellules T2 à la lyse par le clone CTL M134.12.

EXAMPLE 3 : EXPRESSION DE MMP-2 DANS DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES, ET RECONNAISSANCE SPECIFIQUE DE CELLULES DE MELANOME PAR LES CTLs M134.12

15 Il est connu que MMP-2 est exprimé de façon constitutive par des tissus comme l'endomètre, le foie ou l'aorte (KHASIGOV, Biochemistry, 2001), et par un nombre important de types cellulaires tels que les macrophages, les trophoblastes (YAMAMOTO, Cancer. Res., 1996), les
20 lymphocytes T activés par l'IL-2 (LEPPERT, JI, 1995 Esparza J., BLOOD, 1999), les fibroblastes, les kératinocytes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, les monocytes, ou les ostéoblastes (BIRKEDAL-HANSEN, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 1993).

25 La capacité du clone CTL M134.12 à reconnaître des cellules (tumorales ou saines) de différents types, exprimant MMP-2 (expression vérifiée par RT-PCR et immunohistochimie) et HLA-A2 a été testée, par mesure de la sécrétion de TNF α par le clone CTL M134.12 en réponse
30 à la stimulation par ces cellules. Le protocole utilisé est identique à celui décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I

	Type cellulaire	Cellules cibles	Reconnaissance par le clone CTL M134.12
Lignées tumorales	Mélanome	M17	+
		M113	+
		M134	+
		M147	+
		M153	+
		M204	+
		FM25	+
		FM29	+
		IPC 277/5	+
		GMEI	-
		M88	-
		M117	-
Lignées saines	Cancer colorectal	Sw480	-
	Carcinome de rein	A498	-
		R28	-
	Ovaire	OVCAR	-
	Thyroïde	TT	-
	Mélanocytes	98M09	-
		01MO08	-
	Kératinocytes	K1	-
	Fibroblastes	MG	-
		HFFF2	-
	Endothélium	HAEC#8186	-

Ces résultats montrent que 10 des lignées cellulaires de mélanome qui expriment MMP-2 sont reconnues par le clone CTL M134.12.

En revanche, bien qu'exprimant MMP-2 et HLA-A2, aucune des autres lignées de cellules cancéreuses, et aucune lignée de cellules non-cancéreuses n'est reconnue par le clone CTL M134.12.

En conclusion, malgré le profil d'expression ubiquitaire de la protéine MMP-2, seules les cellules de mélanome paraissent avoir la capacité de présenter efficacement un épitope de cette protéine.

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une molécule choisie parmi :
 - la métalloprotéase MMP-2 ;
 - un fragment de ladite métalloprotéase
- 5 comprenant un épitope T présenté par le CMH I ;
 - un polynucléotide codant pour ladite métalloprotéase ou pour ledit fragment ;
- pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale.
- 10 2) Peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de la métalloprotéase MMP-2.
- 3) Peptide immunogène selon la revendication
- 15 2, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence GLPPDVQRV.
- 4) Polynucléotide codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 5) Composition comprenant au moins un peptide
- 20 selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou un polynucléotide selon la revendication 5.
- 6) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou d'un polynucléotide selon la revendication 5 pour l'obtention
- 25 d'un médicament.
- 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de mélanomes.
- 8) Cellule présentatrice de l'antigène
- 30 exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est chargée par un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 9) Cellule présentatrice de l'antigène
- 35 exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est transfectée par un polynucléotide comprenant

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une molécule choisie parmi :
 - la métalloprotéase MMP-2 ;
 - un fragment de ladite métalloprotéase
- 5 comprenant un épitope T présenté par le CMH I ;
 - un polynucléotide codant pour ladite métalloprotéase ou pour ledit fragment ;

pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale.
- 10 2) Peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de la métalloprotéase MMP-2.
- 15 3) Peptide immunogène selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence GLPPDVQRV.
- 4) Polynucléotide codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 20 5) Composition comprenant au moins un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou un polynucléotide selon la revendication 4.
- 6) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3, ou d'un polynucléotide selon la revendication 4 pour l'obtention
- 25 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de mélanomes.
- 8) Cellule présentatrice de l'antigène isolée
- 30 exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est chargée *in vitro* par un peptide selon une quelconque des revendications 2 ou 3.
- 9) Cellule présentatrice de l'antigène exprimant une molécule du CMH I, caractérisée en ce
- 35 qu'elle est transfectée par un polynucléotide comprenant

une séquence codant pour un peptide immunogène selon une quelconque des revendications 2 ou 3.

10) Utilisation de la métalloprotéase MMP-2 ou d'un fragment de celle-ci pour la détection de 5 lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre MMP-2 dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet atteint de mélanome.

11) Procédé de préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2, 10 caractérisé en ce qu'il comprend la sélection, à partir de lymphocytes T cytotoxiques prélevés sur un patient atteint de mélanome, de ceux reconnaissant MMP-2 ou un fragment de celle-ci, et la multiplication *in vitro* des lymphocytes T ainsi sélectionnés.

15 12) Préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2.

13) Médicament, comprenant un principe actif choisi parmi :

- un peptide immunogène selon une quelconque 20 des revendications 2 ou 3 ;

- un polynucléotide selon la revendication 4 ;
selon une quelconque des revendications 8 ou 9 ;

25 - une préparation de lymphocytes T cytotoxiques selon la revendication 12.

une séquence codant pour un peptide immunogène selon une quelconque des revendications 2 ou 3.

10) Utilisation de la métalloprotéase MMP-2 ou d'un fragment de celle-ci pour la détection de 5 lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre MMP-2 dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet atteint de mélanome.

11) Procédé de préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2, 10 caractérisé en ce qu'il comprend la sélection, à partir de lymphocytes T cytotoxiques prélevés sur un patient atteint de mélanome, de ceux reconnaissant MMP-2 ou un fragment de celle-ci, et la multiplication *in vitro* des lymphocytes T ainsi sélectionnés.

15 12) Préparation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la métalloprotéase MMP-2, laquelle préparation est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 11.

13) Médicament, comprenant un principe actif 20 choisi parmi :

- un peptide immunogène selon une quelconque des revendications 2 ou 3 ;
- un polynucléotide selon la revendication 4 ;
- une cellule présentatrice de l'antigène 25 selon une quelconque des revendications 8 ou 9 ;
- une préparation de lymphocytes T cytotoxiques selon la revendication 12.

1er dépôt

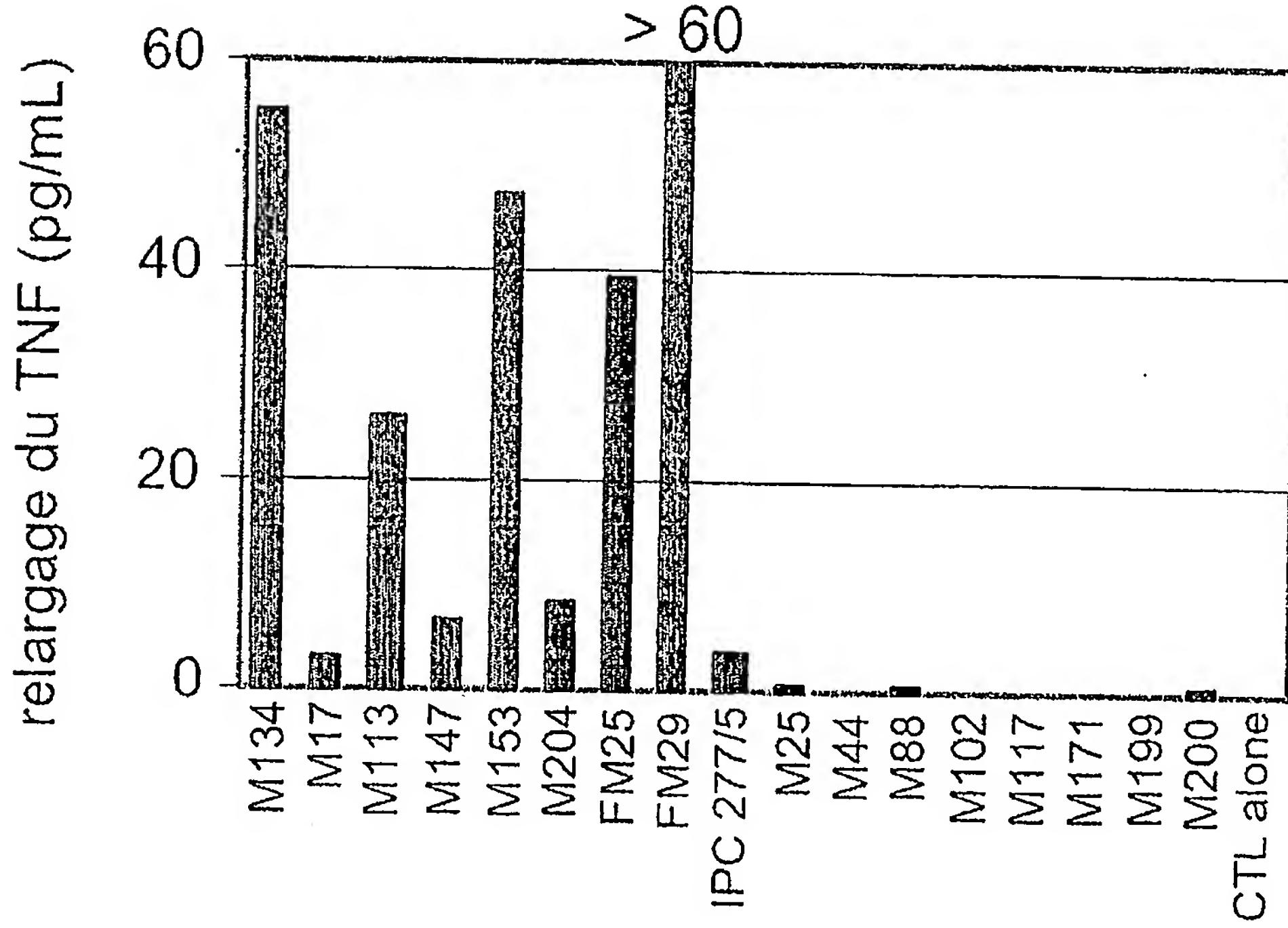


FIG 1

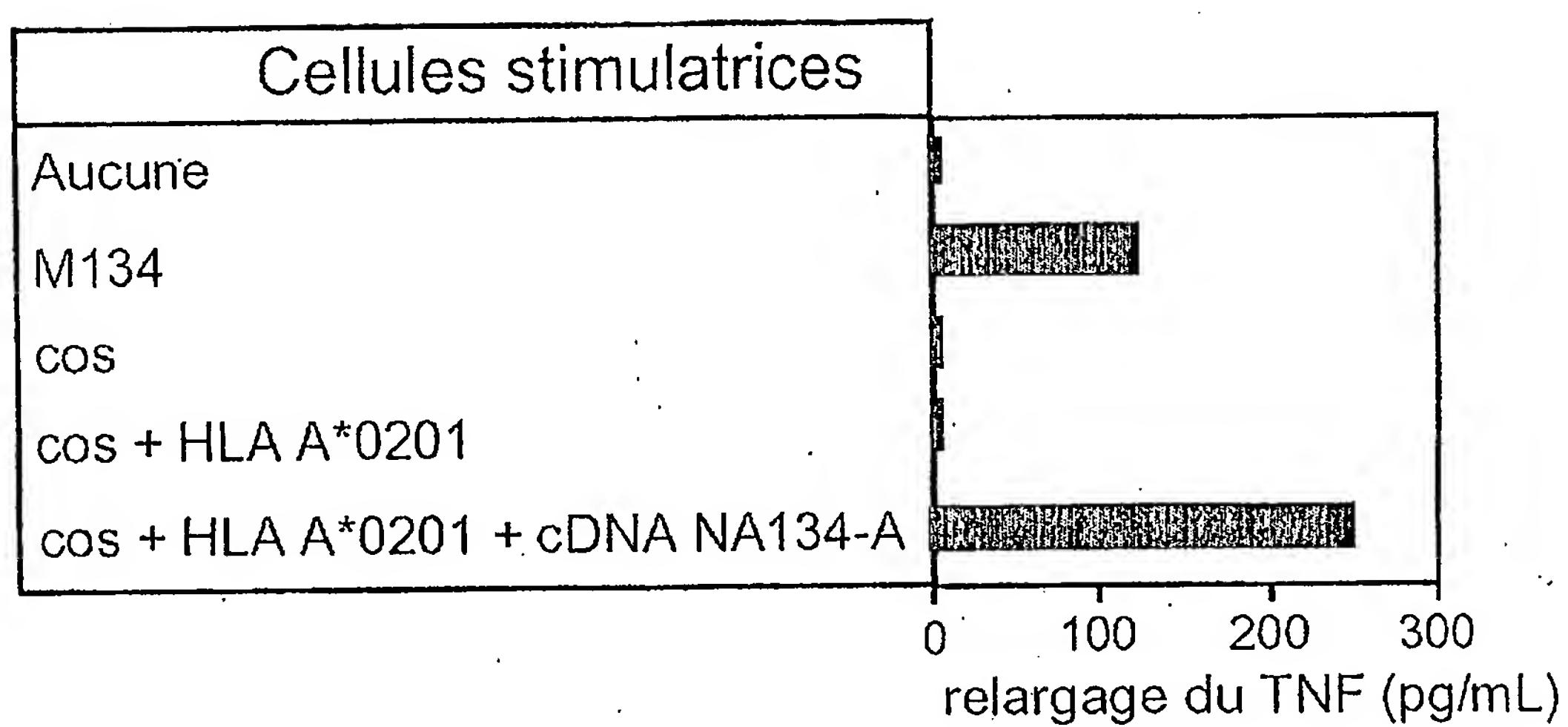


FIG 2

TNF

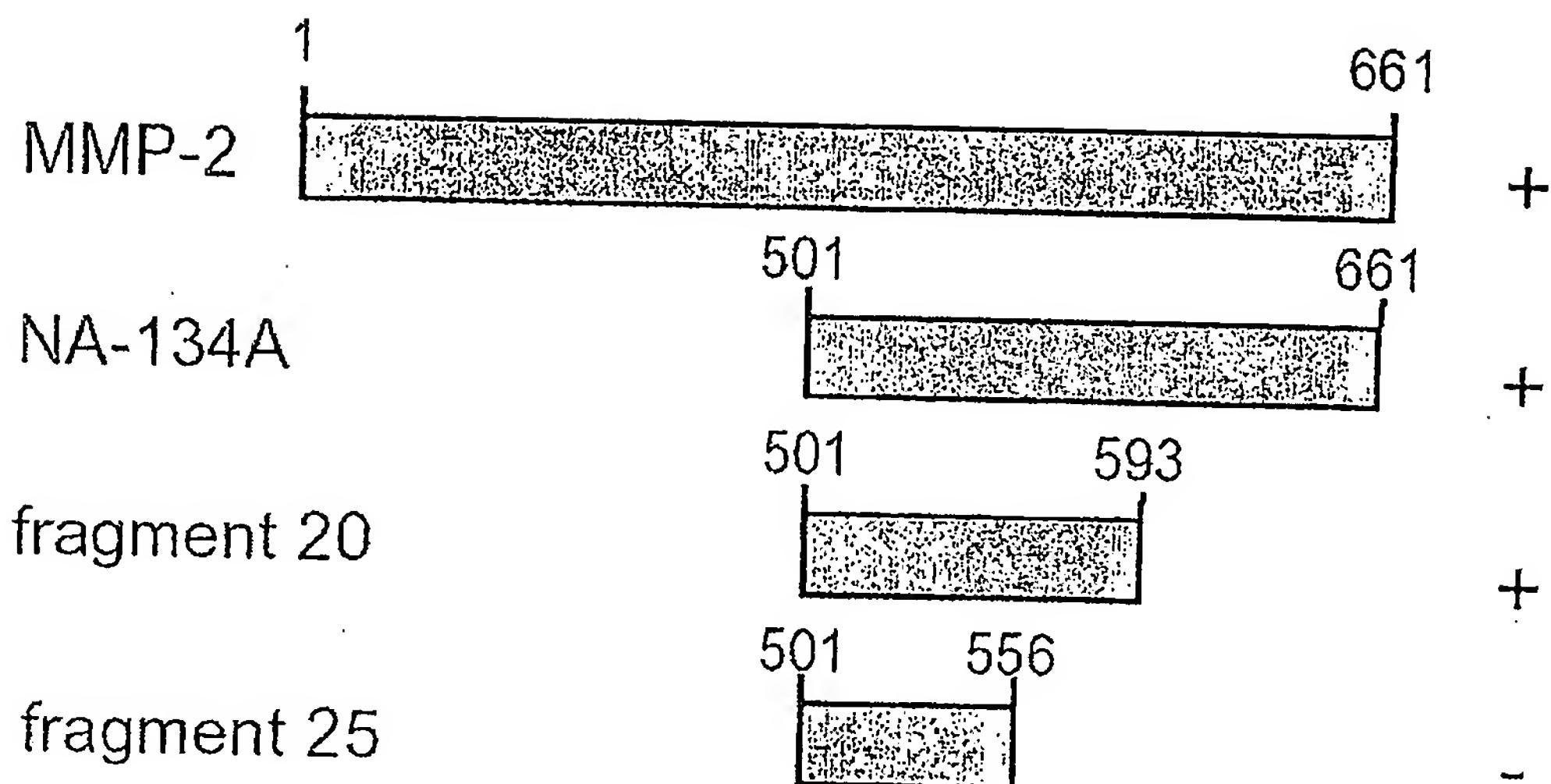


FIG 3

1er dépôt

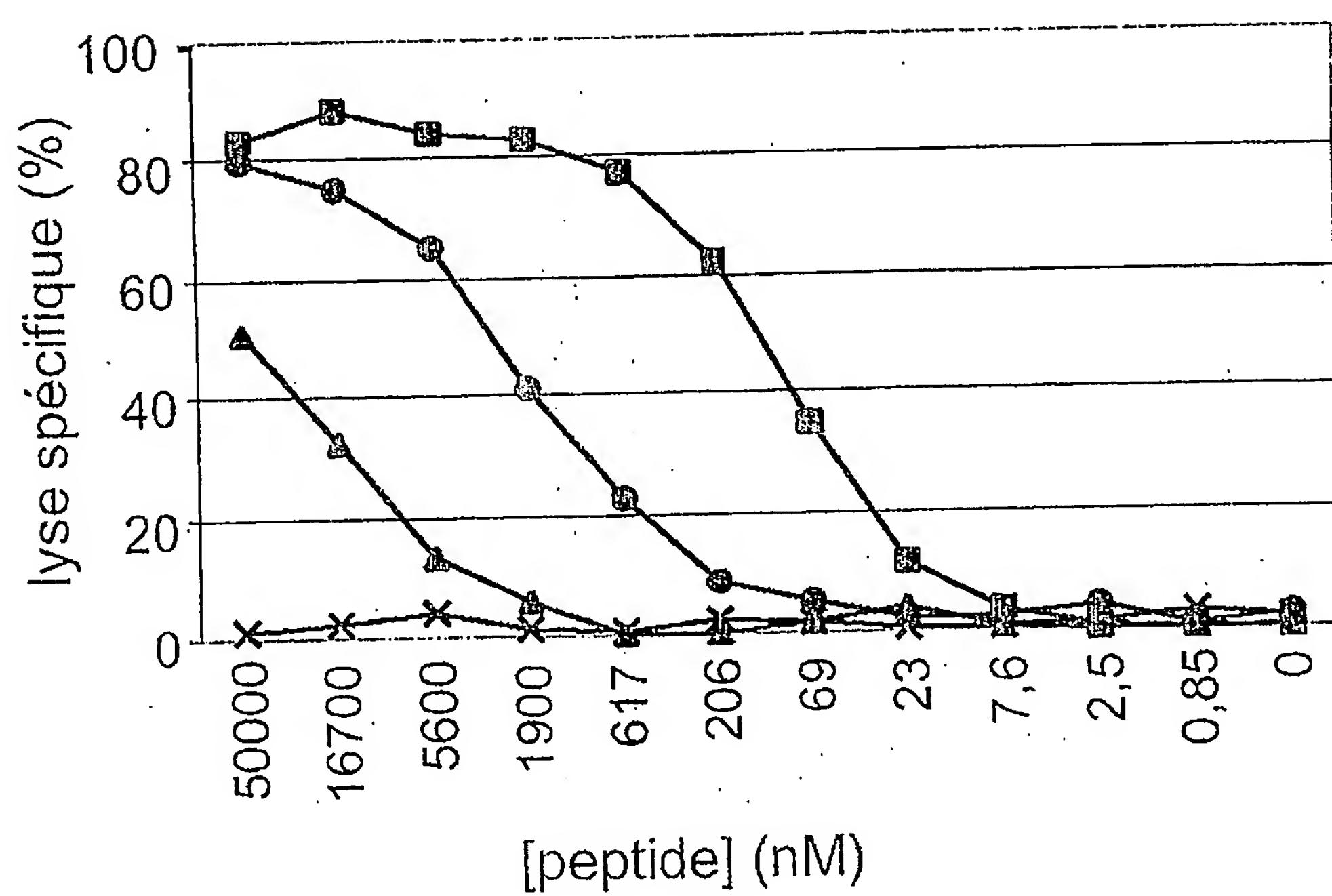


FIG 4

0598-077-SEQ.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> INSERM

<120> Peptides dérivés de la protéine MMP-2
et leur utilisation en immunothérapie
antitumorale

<130> MJPah-598/77

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val
1 5 10

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

0598-077-SEQ.ST25

<400> 3

Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg
1 5

reçue le 03/06/04



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indigo 0 825 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 210103



Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJP/ah-F598/77FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0307659
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Peptides dérivés de la protéine MMP-2 et leur utilisation en immunothérapie antitumorale.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
VIALLE-PRESLES Marie-José CABINET ORES 36, rue de St Pétersbourg 75008 PARIS FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		GUILLOUX
Prénoms		Yannick
Adresse	Rue	19, rue du Loquidy
	Code postal et ville	14 143 01 NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		JOTEREAU
Prénoms		Francine
Adresse	Rue	6, Place du 116ème Régiment d'Infanterie
	Code postal et ville	14 143 01 NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		GODEFROY
Prénoms		Emmanuelle
Adresse	Rue	59, rue Fontaine de Barbin
	Code postal et ville	14 140 01 NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

VIALLE-PRESLES Marie-José



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

► N° Indigo 0 825 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11235*03



08 113 0 W / 210103

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

Vos références pour ce dossier (facultatif)	MJP/ah-F598/77FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0307659
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
Peptides dérivés de la protéine MMP-2 et leur utilisation en immunothérapie antitumorale.	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

VIALLE-PRESLES Marie-José
CABINET ORES
36, rue de St Pétersbourg
75008 PARIS
FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom	DIEZ	
Prénoms	Elisabeth	
Adresse	Rue	13, rue Ramée La Bourchinière
	Code postal et ville	[4 141 61 91 0] SAINT FIACRE SUR MAINE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom	AUBRY	
Prénoms	Agnès	
Adresse	Rue	11, Impasse Minatte
	Code postal et ville	[4 141 01 01 0] NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	[] [] [] [] []
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)**DU (DES) DEMANDEUR(S)****OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

VIALLE-PRESLES Marie-José

PCT/FR2004/001585

